UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

400

J. A. ROSEMBERG - P. GAMBOGI

INTORNO ALLA MICROFLORA PRESENTE NELLE CARIOSSIDI DI AVENA

Estratto dagli « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XX - 1959

EDITRICE GIARDINI - PISA

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL INSTITUTE
18 MAR 1960

UNIVERSITA' DI PISA
ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E DI MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA
OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

400

J. A. ROSEMBERG - P. GAMBOGI

INTORNO ALLA MICROFLORA PRESENTE NELLE CARIOSSIDI DI AVENA

Estratto dagli « *Annali Facoltà di Agraria* » - Vol. XX - 1959

EDITRICE GIARDINI - PISA

ISTITUTO DI PATOLOGIA VEGETALE E MICROBIOLOGIA AGRARIA E TECNICA

J. A. ROSEMBERG (*) - P. GAMBOGI

INTORNO ALLA MICROFLORA PRESENTE NELLE CARIOSSIDI DI AVENA

A parte i primi più antichi studi di HOFFMANN (1), DÜGGELI (2) e MORGENTHALER (3) non sono molte le ricerche eseguite sulla microflora che accompagna i semi.

D'altra parte non tutti i lavori più recentemente comparsi — e tra i quali piace ricordare quelli di TIMONIN (4), SLYKHUIS (5), WALLACE e LOCKHEAD (6), ROVIRA (7), SPICHER (8), ROTH (9), MACURA (10) — interessano direttamente l'argomento.

TIMONIN, ad es., studia la popolazione microbica del seme già germinato e quindi dei primi momenti nei quali si stabilisce la rizosfera; e trova che le radichette fuoriuscenti dal seme ospitano una flora batterica notevolmente superiore a quella del terreno. Meno rilevante l'incremento verificatosi nella flora fungina.

SLYKHUIS studia i funghi presenti nei semi da prato ma, lo stesso studio, è condotto con finalità fitopatologiche e quanto in esso alla fine si argomenta, sembra interessare più che altro i fenomeni di antagonismo che, verso le specie fitopatogene, si stabiliscono intorno al seme.

WALLACE e LOCKHEAD dimostrano (come, in gran parte, ebbe a dimostrare DÜGGELI) che i semi portano una microflora caratterizzata da un'alta percentuale di specie cromogene.

ROVIRA conferma i risultati di WALLACE e LOCKHEAD, ma solo in parte perchè nei semi di pomodoro trova, ad es., una forte prevalenza di bacilli sporigeni. Nota inoltre ROVIRA che gli apici radicali dell'avena non portano microrganismi, presenti invece nei peli radicali per la presenza intorno a questi di polisaccaridi trofici.

(*) Borsista del Consiglio Nazionale delle Ricerche del Brasile.

Gli Aa. ringraziano vivamente il Ch.mo Prof. O. Verona per i suggerimenti offerti durante il corso del lavoro.

SPICHER eseguisce conte sui batteri e sui funghi presenti nelle cariossidi di grano e di segale e ne studia le variazioni in rapporto alle condizioni di conservazione.

ROTH studia l'azione esercitata dai sali di mercurio sulla conservazione e germinazione dei semi di orzo; ma, nello stesso tempo studia anche l'azione che questi sali esercitano sulla microflora del seme.

MACURA finalmente, mette in rilievo che i batteri presenti nel seme si rinvengono in seguito sulle radici ed evidenzia alcune interferenze che si stabiliscono tra la microflora che accompagna semi e radici e quella normalmente presente nel terreno. I batteri aminoacido-dipendenti, ad es., dominanti in mezzo asettico, finiscono col cedere la loro prevalenza ai comuni assimilatori di ammoniaca quando il mezzo venga inquinato con terra.

* * *

La non esauriente conoscenza della microflora che accompagna i semi doveva suggerre qualche ricerca in questo senso. D'altronde, l'argomento si inquadra anche entro il concetto di spermosfera (11) in quanto alla stessa concorrono non solo i microrganismi presenti nel mezzo ove il seme germina, ma anche i microrganismi portati dal seme (VERONA).

L'argomento è vasto poichè ogni seme può costituire oggetto di studio e diversi — anche in riferimento ai grandi gruppi sistematici — possono essere i microrganismi che negli stessi semi si rinvengono.

Varie ricerche, pertanto, sono in corso e di esse verrà, volta a volta riferito. Per intanto qui si dà un primo elenco dei micromiceti e degli attinomiceti rinvenuti in campioni di avena di varia provenienza.

* * *

Esattamente sono stati esaminati n. 15 campioni procedendosi, per ogni campione, nel modo seguente.

Prelevato un certo numero di cariossidi, la superficie di ciascuna fu accuratamente raschiata con ferro sterile. Il materiale raccolto veniva quindi disperso in poca acqua sterile con gocce della quale, dopo agitazione ripetuta, si inficiavano capsule Petri allestite con agar-fagiuoli, agar-carote, agar-Czapek, agar-malto.

Incubazione a 28° C. e isolamento, infine, delle specie presenti.

E' necessario aggiungere che, per renderci meglio conto della dominanza e frequenza delle varie specie, la ricerca, per ogni campione, è stata più volte ripetuta.

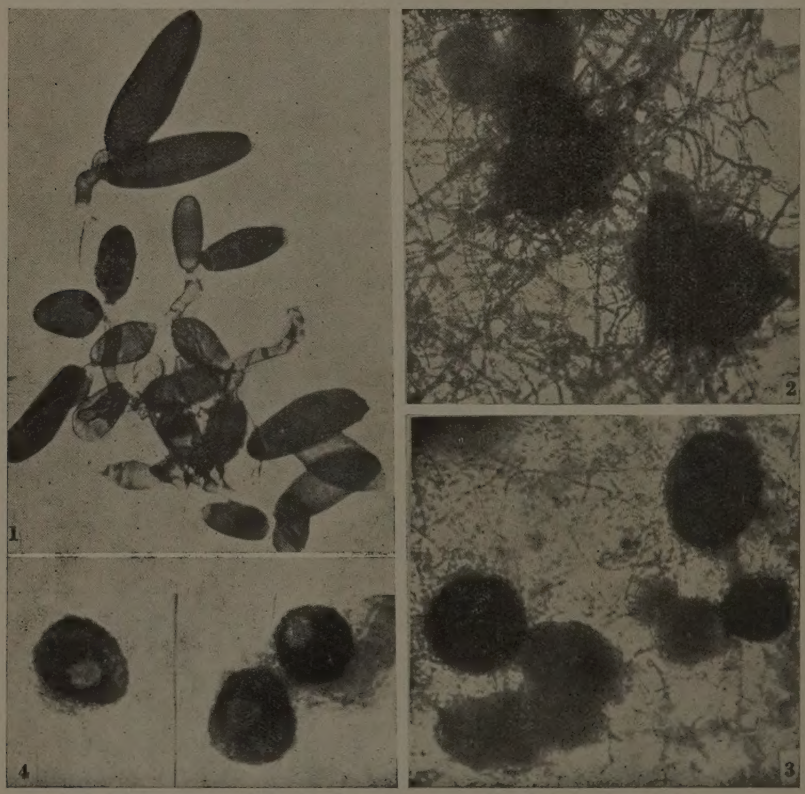
SPECIE	CAMPIONI																
	Estero 1	Estero 2	Castellan.	Lecce	Gallipoli	Ragusa	Grave	Precoce	Capaccio	Potenza	Asciano	Ombrone	Celangiani	Lucedonia	Pisa	% di pres. di varie sp.	% di freq. (°)
1 Alternaria tenuis Nees.	11(13)	10(10)	10(12)				6(9)	8(9)	5(10	1(8)	6(12)	4(8)	5(10)	6(10)		73,3	46.7
2 Asp. flavus-oryzae (gruppo)	4(13)		1(12)			2(10)	1(9)	2(9)	1(10)		1(12)			1(10)	1(12)	60,—	9,9
3 Asp. flavipes (Bain. et Sart.) Thom et Church															1(12)	6,6	0,6
4 Asp. niger v. Tieghem	1(13)		1(12)		1(9)	5(10)	1(9)	4(9)	1(10)		1(12)		2(10	1(10)		66,6	11,6
5 Asp. terreus Thom	5(13)				3(9)											13,3	5,2
6 Cladosporium cladosporioides (Fres.) de Vries			8(12)	2(12)								4(8)				20,—	9,9
7 Clad. herbarum Link	11(13)		4(12)	6(12)	8(9)					5(8)	9(12)				2(12)	46,6	23,3
8 Cladosp. macrocarpum Preuss											10(12)			3(10)		13,3	8,4
9 Cryptococcus diffluens Zach.	2(13)	1(10)														6,6	1,3
10 Dendryphion sp.		2(10)														6,6	0,6
11 Epicoccum purpurascens Ehnberg					3(9)											13,3	3,2
12 Fusarium sp.				5(9)												6,6	3,2
13 Helminthosporium avenae Eidam	1(13)															6,6	0,6
14 Papularia sphaerosperma (Pers.) v. Höhn					1(9)											6,6	0,6
15 Penicillium canescens Sopp.			8(12)													6,6	5,2
16 Pen. frequentans Westl.	9(13)		1(12)							4(8)	10(12)	3(8)	5(10)			40,—	14,1
17 Pen. liliacinium Thom	2(13)	5(10)			4(9)	6(10)	8(9)	5(9)	10(10)				10(10)	9(10)		60,—	38,3
18 Phoma sp. (1)	1(13)															6,6	0,6
19 Phoma sp. (2)		1(10)														6,6	0,6
20 Phoma sp. (3)						1(10)										6,6	0,6
21 Pullularia pullulans (de Bary et Löw) Berkh.	2(13)						1(9)									13,3	0,6
22 Rhizopus nigricans Ehrenberg	1(13)		1(12)				2(9)	2(9)	2(10)					1(10)		40,0	5,8
23 Rhodotorula mucilaginosa (Jörg.) Harrison	2(13)										2(12)					13,3	2,6
24 Scopulariopsis brevicaulis (Sacc.) Bain.										1(8)						6,6	0,6
25 Stemphylium sp.				4(12)	2(9)		1(9)							1(10)	1(12)	33,3	5,8
26 Stysanus stemonitis (Pers.) Cda.							1(9)									6,6	0,6
27 Trichoderma koningii Oud.		4(10)			1(9)						1(12)		1(10)			26,6	4,5
28 Verticillium sp.		5(10)				6(9)	6(9)	4(9)					3(10)		1(12)	40,—	16,2

$$\% \text{ di frequenza} = \frac{\text{n°. totale degli isolamenti x 100}}{\text{n°. totale delle analisi eseguite sui 15 campioni}}$$

I risultati conseguiti sono esposti in Tabella e, in relazione a quanto detto, ogni specie rinvenuta in ciascun campione figura accompagnata da due numeri: il primo indica il numero dei rinvenimenti; il secondo, tra parentesi, il numero dei saggi eseguiti. Nella stessa Tabella è anche indicato, a margine, il % di presenza delle varie specie e il % di frequenza.

* * *

Con riferimento alla ricordata Tabella si osserva che in tutti i campioni esaminati sono stati rinvenuti micromiceti; in alcuni il ritrovamento si è



1. Helminthosporium avenae
2. Phoma sp. n°. 1
3. » » » 2
4. » » » 3

limitato a poche specie (3-4 ad es.), in altri ad un numero più elevato (fino a 9-13).

Alcune specie sono poi apparse presenti in alta percentuale, contro altre apparse del tutto sporadiche:

% di presenza delle varie specie	
73.3	Alternaria tenuis
66,6	Asp. niger
60.—	Asp. flavus-oryzae, Pen. liliacinum
46.6	Cladosporium herbarum
40.—	Pen. frequentans, Rhizopus nigricans, Verticillium sp.
33..3	Stemphylium sp.
26.6	Trichoderma koningii
20.—	Clad. cladosporioides
13.3	Asp. terreus, Cladosp. macrocarpum, Epicoccum purpurascens, Pullularia pullulans, Rhodot. mucilaginosa
6.6	Asp. flavipes, Cryptococcus diffluens, Fusarium sp., Helminthosporium avenae, Papularia sphaerosperma, Pen. canescens, Dendryphium sp., Phoma sp., Scopulariopsis brevicaulis, Stysanus stemonitis.

Così dicasi per la frequenza particolarmente rilevante per *Alternaria tenuis, Pen. liliacinum, Clad. herbarum.*

* * *

La definizione delle specie non ha offerto particolari difficoltà. Con tutto ciò, in mancanza di materiale di confronto, abbiamo lasciato indeterminata una specie di *Fusarium*, una di *Dendryphium, Stemphylium, Verticillium,* nonchè tre specie di *Phoma* queste tra loro ben distinte sia per i caratteri colturali che per i caratteri morfologici.

Di tali ultime specie desideriamo dare una breve descrizione.

— *Phoma n°.* 1.

Coltura in agar costituita da vegetazione da prima chiara, di colore rosato che in seguito si fa bruna fino a nerastra per la comparsa di numerosissimi picnidi di aspetto carbonaceo.

Picnidi globosi, ovali od anche leggermente piriformi, neri-carbonacei di μ (170-185) x (115-130); picnospore globose od anche subovali di μ (2,5-3) x (2-2,5).

Il carattere delle picnospore globose distingue abbastanza bene questa specie di *Phoma* della maggior parte delle altre, in genere provviste di spore decisamente ellittiche o cilindriche. Con tutto ciò non ci è riuscito possibile alcun esatto riferimento specifico.

— *Phoma n°* 2.

Aspetto della vegetazione simile al precedente.
Picnidi, anche in questo caso nero-carbonacei, più decisamente globosi e un poco più piccoli misurando μ (130-155) x (115-130). Picnospore ialine, ellittiche, di μ (4.8-7.2(6)) x (1.8-3(2.5)).

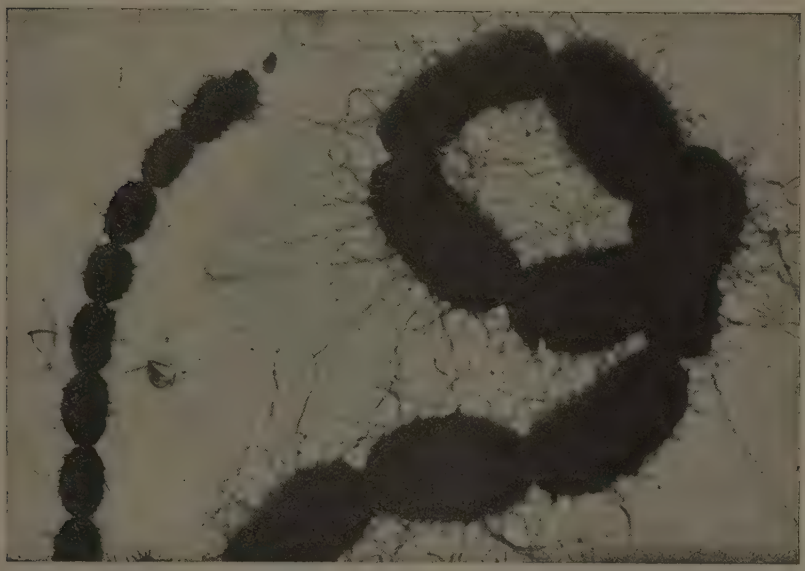
— *Phoma n°* 3.

Vegetazione che da chiara si fa brunastra senza peraltro assumere aspetto carbonaceo.
Picnidificazione uno poco meno abbondante che nei ceppi n°. 1 e 2.
Picnidi brunastri, globosi od ovalari, largamente ostiolati misuranti μ (65-140) x (50-80).
Picnospore ialine, ellittiche, di μ (5.4-7.2(6)) x (2.4-3).

Oltre alle ricordate specie di funghi, dai diversi campioni esaminati furono isolati anche n. 8 ceppi di Attinomiceti, qui descritti nei loro caratteri fondamentali. Ne è anche tentato il riferimento sistematico limitatamente alla serie, in questo cortesemente aiutati dal Prof. Elio Baldacci che subito desideriamo ringraziare.

Nei riguardi di tale riferimento occorre dire come per esso non si sia tenuto conto, al momento, della struttura degli sporofori e quindi della possibile inclusione nel nuovo genere *Streptoverticillium*, genere istituito e in corso di pubblicazione da parte di Baldacci. Questo genere, come avverte la sua denominazione e come lo stesso Autore si è compiaciuto di informarci, è basato sulla presenza di sporofori verticillati o biverticillati.

Se tale genere dovesse essere accettato e pertanto dovesse essere presa in particolare considerazione la struttura degli sporofori, due dei ceppi qui descritti dovrebbero passare — come nelle singole descrizioni verrà avvertito — al ricordato genere e, forse, come nuove specie.



Ceppo 1 nc

Riferimento di serie: *ALBIDOFLAVUS*.

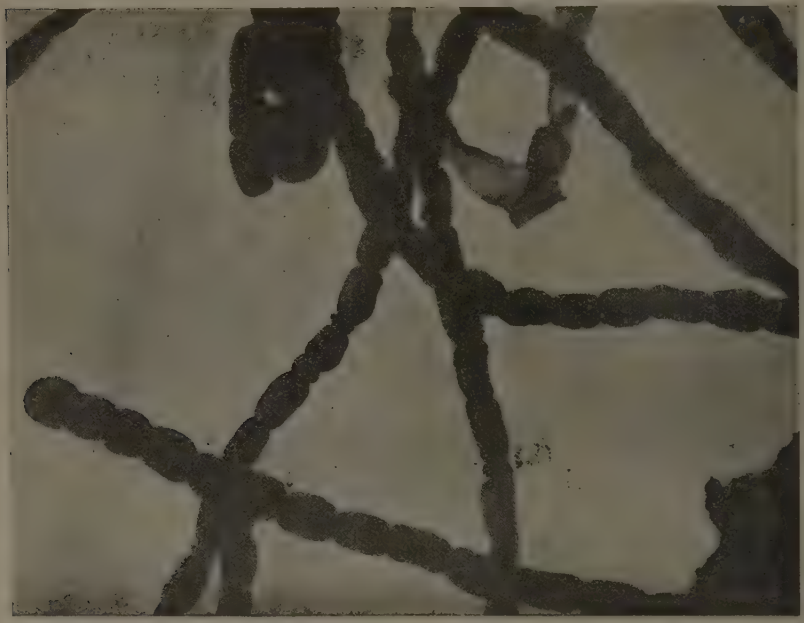
Caratteri colturali e microscopici.

Micelio aereo permanentemente bianco; micelio vegetativo, giallo.
Spore ovoidi provviste di numerose ciglia.
Sporoidi da diritti a flessuosi.

Caratteri fisiologici.

Fludifica la gelatina.
Coagula e peptonizza il latte.
Idrolizza l'amido.
Riduce i nitrati a nitriti.
Attività antibiotica scarsa o nulla (°).

(°) Rilevata attraverso le zone di inibizione in colture eseguite secondo la tecnica dello striscio a croce. Germi test: *Bac. subtilis*, *E. coli*, *S. aureus*, *Sacch. cerevisiae*, *Candida albicans*.



Ceppo 1 na

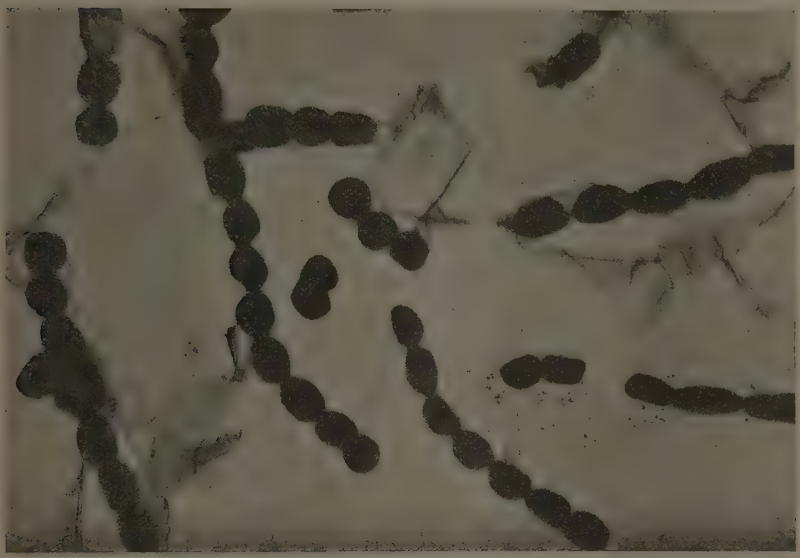
Riferimento di serie: *FLAVUS*.

Caratteri colturali e microscopici.

Micelio aereo prima grigio-crema, indi giallo-grigio; micelio vegetativo giallo. Spore cuboido-cilindriche; sporofori diritti o flessuosi.

Caratteri fisiologici.

Fluidifica energicamente la gelatina.
Coagula il latte con peptonizzazione del coagulo.
Rapida idrolisi dell'amido.
Scarsa riduzione dei nitrati a nitriti.
Attività antibiotica: discreta per *B. subtilis* e S *aureus*; più che discreta verso i lieviti.



Ceppo 2 c

Riferimento di serie: *FLAVOVIRIDIS*.

Caratteri colturali e morfologici.

Micelio aereo prima bianco, poi grigio; micelio vegetativo giallognolo con sfumature verdi dopo del tempo.

Spore ovoidi; sporofori flessuosi.

Caratteri fisiologici.

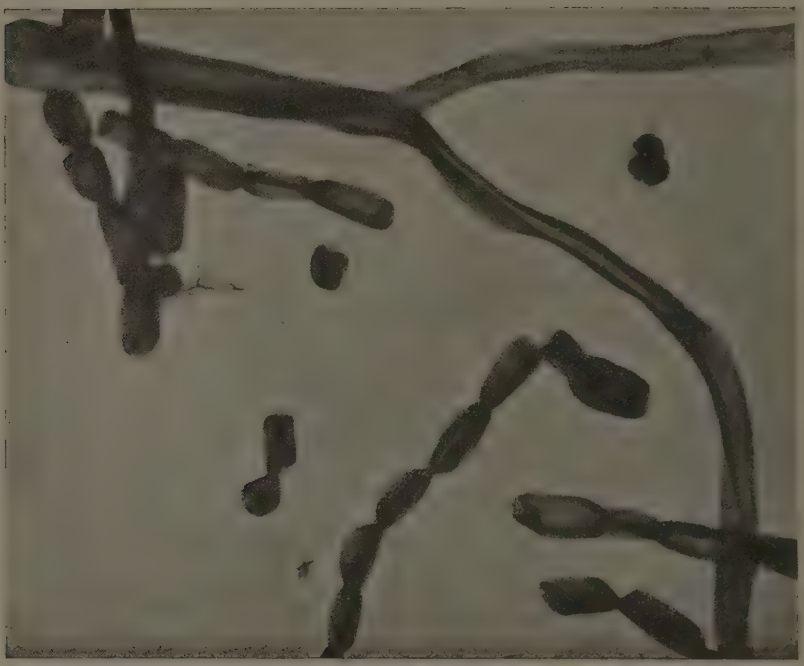
Fluidificazione della gelatina rapida.

Coagulazione e peptonizzazione del latte.

Energica idrolisi dell'amido.

Scarsa riduzione dei nitrati a nitriti.

Attività antibiotica debole sia per gli Schizomiceti che per i lieviti.



Ceppo 4 va

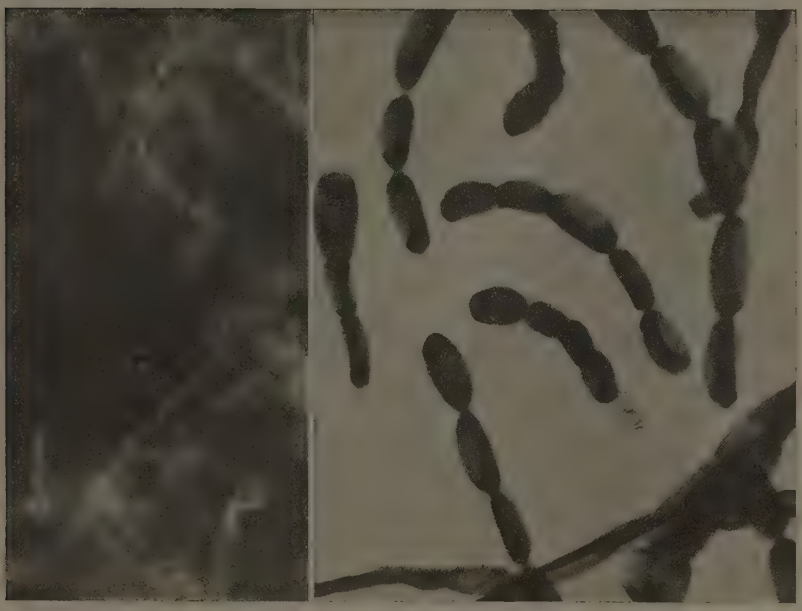
Riferimento di serie: *DIASTATICUS*

Caratteri colturali e morfologici.

Micelio aereo dal bianco-grigio al grigio; micelio vegetativo incolore.
Spore cilindro-ovoidi; sporofori flessuosi.

Caratteri fisiologici.

La gelatina fluidifica lentamente.
Il latte coagula e peptonizza.
Positiva la riduzione dei nitrati a nitriti.
Attività antibiotica discreta verso gli Schizomiceti; non sempre positiva per i lieviti.



Ceppo 1 - II - vd

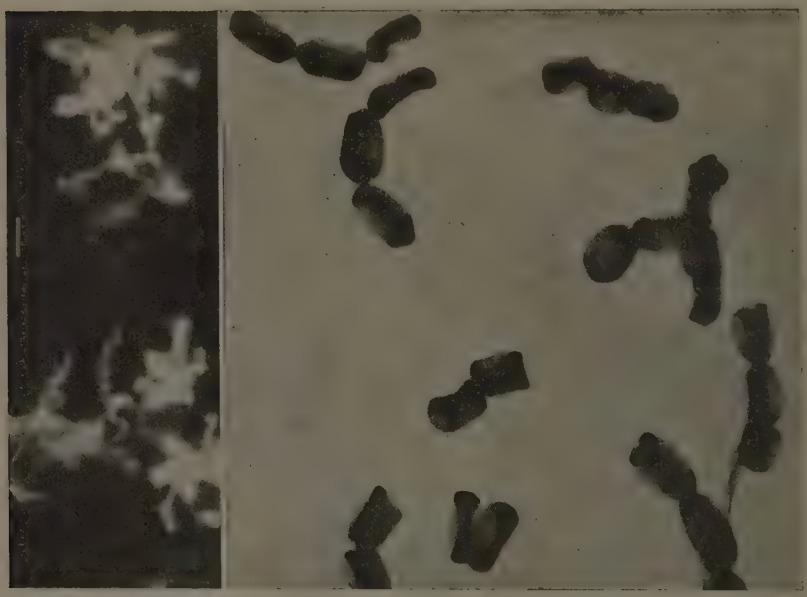
Riferimento di serie: *AUREUS*.

Caratteri colturali e morfologici.

Su agar-patata micelio aereo grigio od anche bianco-grigio con sfumature rosa. Micelio vegetativo giallo .
Spore cilindro-ellipsoidee. Sporofori flessuosi o spiralati.

Caratteri fisiologici.

Fluidifica la gelatina.
Coagula il latte.
Idrolizza l'amido.
Riduce, ma molto poco, i nitrati a nitriti.
Attività antibiotica: nulla verso gli Schizomiceti, debole verso i lieviti.



Ceppo 1 - II - va

Riferimento di serie: *AUREUS*.

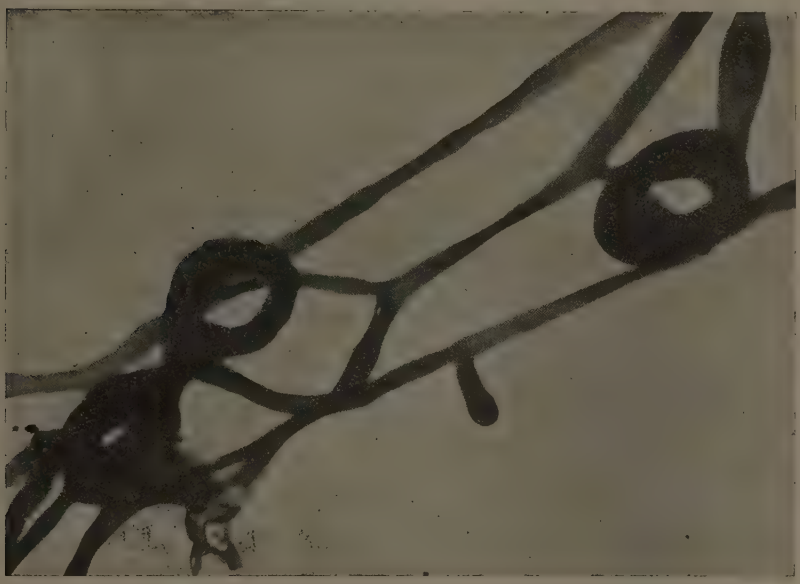
Caratteri colturali e morfologici.

Micelio aereo grigio. Micelio vegetativo giallo che, con il tempo, dà sul marrone. Spore cuboidi o poliedriche. Sporofori con spire aperte e, più tardi, verticillato-spiralati.

Caratteri fisiologici.

Tarda fluidificazione della gelatina.
Coagulazione e peptonizzazione del latte.
Positiva l'idrolisi dell'amido.
Scarsa la riduzione dei nitrati a nitriti.
Attività antibiotica: molto debole sia per gli Schizomiceti che per i lieviti.

Osservazione: qualora si accetti il Gen. *Streptoverticillium* questo ceppo dovrebbe rientrare in questo Genere.



Ceppo - 1 - nd

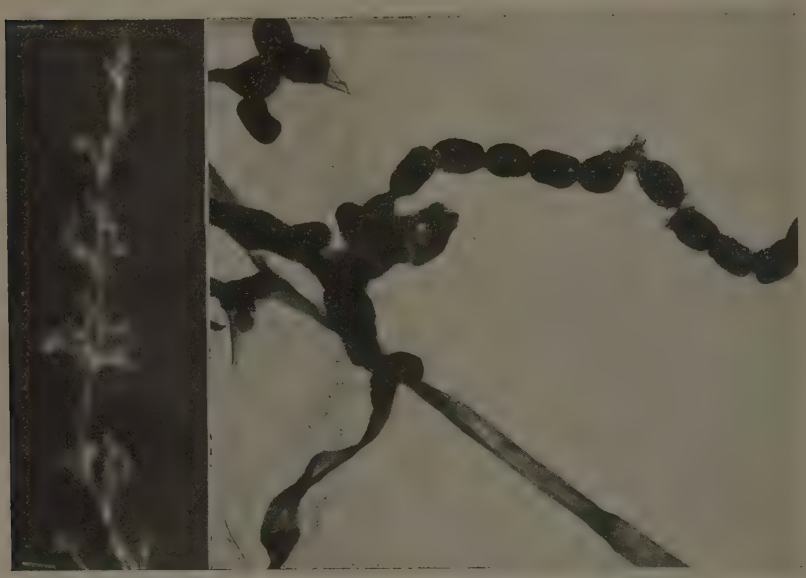
Riferimento di serie: VIOLACEUS

Caratteri colturali e morfologici

Su agar-patata il micelio aereo molto bene sviluppato è inizialmente di colore bianco; al 10° giorno passa però al bianco-viola e quindi e definitivamente al grigio-viola. Il micelio vegetativo all'inizio violaceo con sfumature marroni diviene in seguito viola-scuro-marrone. Per quanto si riferisce all'aspetto morfologico le impronte, ripetutamente eseguite non hanno, a microscopio elettronico, messo in evidenza le spore e questo a causa, forse, dell'ammasso peloso dovuto all'intreccio delle ife del micelio aereo. Si osserva peraltro la formazione di « nidi » (cfr. E. Baldacci e coll. - Giorn. di Microb., vol. 1, p. 512,1956). Gli sporofori sono all'inizio diritti o flessuosi, ma poi costantemente flessuosi.

Caratteri fisiologici

La gelatina non fluidifica
Il latte peptonizza ma molto tardivamente
Dubbia l'idrolisi dell'amido
Positiva la formazione dei nitriti
Attività antibiotica: scarsa o assente per gli Schizomiceti; debole verso i lieviti.



Ceppo 2 *a*

Riferimento di serie: VIOLACEUS.

Caratteri colturali e morfologici

Su agar-patata micelio aereo di colore bianco-grigio e micelio vegetativo dapprima viola-brunastro indi viola-blu-rosso.

Al microscopio elettronico le spore appaiono cuboidi o cilindriche. Gli sporofori sono dapprima spiralati, indi flessuosi, biverticillati.

Caratteri fisiologici

Fluidifica la gelatina
Coagula e peptonizza il latte
Lenta idrolisi dell'amido
Formazione di nitriti da nitrati
Attività antibiotica scarsa o nulla verso gli Schizomiceti, debole verso i lieviti.

Osservazione - Qualora venga accettato il Gen. *Streptoverticillium* il ceppo dovrebbe rientrare entro questo genere.

Conclusioni

L'analisi micologica, più volte ripetuta, di più campioni di cariossidi di avena ha accertato, nelle stesse cariossidi, la presenza costante di micromiceti e la presenza possibile di Attinomiceti.

Alcuni campioni si sono dimostrati più ricchi, altri meno ricchi di specie.

Frequenti, tra i micromiceti, *Alternaria tenuis, Asp. niger, Asp. flavus-orzyae, Pen. liliacinum,* alcuni *Cladosporium.*

Tra gli Attinomiceti i ceppi isolati figurano riferiti alle serie: *Albido-flavus, Flavus, Flavoviridis, Diastaticus, Aureus, Violaceus.*

La conoscenza della micoflora normale e, più in generale, della microflora che accompagna i semi si pensa che possa interessare le questioni riferentesi alla spermosfera.

Riassunto. — *Allo scopo di contribuire ad una migliore conoscenza della spermosfera gli Aa. hanno iniziato una serie di ricerche intorno alla microflora normale che accompagna le cariossidi di avena.*

Nella presente Nota sono riferiti i primi risultati segnalandosi i Funghi e gli Attinomiceti rinvenuti in quindici campioni di avena di diversa provenienza.

BIBLIOGRAFIA

(1) F. Hoffmann - *Wie gross ist die Zahl der Mikroorganismen auf dem Gebreide unter verschiedenen Bedin gungen* - Vschr. Brau, XIII, *44*, 1953, 1806.

(2) M. Düggeli - *Die Bakterienflora gesunder Samen und darans gezogener Keimpflänzchen* - Cent. f. Bakt., II Abt., *12*, 602, 6095, e *13*, 56, 198, 194.

(3) O. Morgenthaler - *Ueber die mikroflora des normalen und muffigen Gebreides* - Landw. Jb. Schweiz, *551*, 1918.

(4) J. Timonin - *The interaction of higher plants and soil micro-organisms* - I: *Microbial population of rhizosphere of seedlings of certain cultivated plants* - Canad. Journ. Res. (C), *18*, 307, 1940.

(5) J. T. Slykhuis - *Studies on Fusarium culmorum blight of crested wheat and brome grass seedlings.* Canad. Journ. Res. (C), *25*, 155, 1947.

(6) R. M. Wallace e A. G. Lockhead - *Bacteria associated with seeds of various crop plants* - Soil Sci., *71*, 159, 1951.

(7) A. D. Rovira - *A study of the development of the root surface microflora during the initial stages of plant growth* - J. Appl. Bact, *19*, 72, 1956.

(8) G. Spicher - *Vergleichende Untersuchungen über die mikroflora des Getreides* - Centr. f. Bakt., *II* Abb., *109*, 589, 1956.

(9) G. Roth - *Einfluss der Quecksilber - Beizung auf Keimung und Jugendvachstrem der Gerste unter besonderer berücksichtingung ihrer selktiven Wirkung auf die samenbegleitende Mikroflora.* Phytop. Zeitschr., *34*, 137, 1958.

(10) J. Macura - *Seed and soil bacteria in relation to the rhizosphere effect* - Zol. Biol., *4*, 274, 1958 [Ref. in Soil. a Fert., 22, 40, 1959).

(11) O. Verona - *La spermosphére* - *Ann. Inst. Pasteur*, 95, 795, 1958.